R. ISTITUTO SUPERIORE AGRARIO DI PISA
LABORATORI DI PATOLOGIA VEGETALE
E DI BATTERIOLOGIA AGRARIA

2.

R. PEROTTI E G. BONAVENTURA

RICERCHE ED OSSERVAZIONI SULLA BIOLOGIA

ED IN ISPECIE SUL PARASSITISMO

DELLA

TUBERCULARIA VULGARIS, TODE

PISA
TIPOGRAFIA MARIOTTI PACINI
1926

Estratto dal *Bollettino del R. Istituto superiore Agrario di Pisa*

Anno 1926.

R. PEROTTI e G. BONAVENTURA

RICERCHE ED OSSERVAZIONI SULLA BIOLOGIA

ED IN ISPECIE SUL PARASSITISMO

DELLA

TUBERCULARIA VULGARIS, Tode

Una porzione di ramo di tiglio, affetto da *Tubercularia vulgaris* ed inviato al Laboratorio di Patologia Vegetale di questo R. Istituto, fu occasione di studio, risultandone alcuni contributi alla conoscenza del parassita che, quantunque abbastanza comune, non sembra sia stato sufficientemente studiato in tutte le sue manifestazioni e relazioni.

L' esposizione dei risultati conseguiti forma oggetto della presente Nota.

Ai fini dello studio non saranno peraltro inutili alcuni cenni riassuntivi su ciò che in merito al parassita in parola è stato già osservato e pubblicato.

Cenni bibliografici.

La *Tubercularia vulgaris* Tode, forma conidica della *Nectria cinnabarina* (Tode) Fries, è la forma sotto cui quest' ultimo pirenomicete si presenta più comunemente.

Il primo che ebbe a confermare in modo inconfutabile l' azione parassitaria del fungo fu Mayr [1] il quale tentò an-

[1] Mayr, *Ueber den Parasitismus von Nectria cinnabarina* — Untersuch. a. d. Forstb. Inst. z., München 1882. — Beck, *Morphologie und Biologie der forstlich. wichtigen Nectria-Arten* — Thar. forstl. Jahrb., 1903.

che di spiegare il modo di azione del parassita medesimo.

Secondo il Mayr, infatti, perchè il promicelio possa penetrare nella pianta occorre che nella corteccia di questa esistano soluzioni di continuità.

Il micelio sviluppandosi e percorrendo i vasi longitudinalmente, attaccherebbe le cellule dei raggi midollari distruggendo l'amido in esse contenuto e conseguendone impedimento nella circolazione della linfa con danneggiamento e necrosi dei rami e del legno che resta annerito.

Il cambio, la corteccia e il cilindro centrale però non verrebbero direttamente attaccati: si tratterebbe perciò di un saprofita. Solo in condizioni speciali si verificherebbe un vero attacco parassitario.

Wehmer,[1] invece, giunge a conclusioni opposte, affermando che il micelio, anzichè il legno, invada la corteccia, mentre Mangin ritorna alle conclusioni di Mayr.

In quali regioni l'attacco parassitario avvenga principalmente, ancor oggi si può ritenere non sia bene accertato.

Secondo Neger,[2] o l'infezione prenderebbe origine da lesioni delle radici od alla base del tronco, donde poi il micelio si diffonderebbe in alto, su per i vasi, ostruendoli e determinando un rapido avvizzimento delle foglie.

La zona del legno attaccata si rende evidente, a seconda della specie, per la colorazione verdognola, bruna, talvolta violetta.

Oppure l'infezione si determinerebbe attraverso ferite di organi aerei decadenti o morti, senza questo carattere del legno, ma con le manifestazioni della *Tubercularia,* in ispecie con i caratteristici sporodochi.

---

[1] Vehmer Z., *Parasitism v. Nectria cinnabarina* — Zeitschrf. f. Pflanzenkr., IV, 1924, p. 74, 1885. p. 268.

[2] Neger, *Die Krankheiten unserer Valdbäume,* F. Enke, Stuttgart 1919.

Il micelio quindi, pur penetrando per la corteccia ed attaccandola più o meno profondamente, emettendo da essa i suoi organi riproduttori, andrebbe a procurarsi il suo nutrimento nella parte più fornita di sostanze nutritive, come i tessuti ricchi di amilacei, *e forse nei succhi aventi un debole grado di acidità;* penetrerebbe quindi nei raggi midollari e nei vasi, rifugiandosi negli altri tessuti solo quando le cellule di essi siano già state uccise.

Dal punto di vista morfologico e sistematico il fungo è descritto e catalogato nelle opere classiche micologiche:[1] particolarmente risulta che esso ha formato oggetto di studio da parte di Paoletti il quale ha pubblicato in proposito una memoria notevole.[2]

Osservazioni ed esperienze.

La porzione di ramo di tiglio esaminata, si presentava cosparsa di un numero rilevente di sporodochi emergenti dalle screpolature della corteccia, rotondeggianti ed assai consistenti, riuniti in aggruppamenti più o meno numerosi o susseguentisi in file più o meno regolari. Potevansi anche distinguere per due colorazioni diverse: rosso-aranciata e bruno-scura, dipendentemente dal diverso stadio di maturazione e da accumulo di prodotti di secondaria formazione.

Allo scopo di poter determinare la struttura di queste

---

[1] *Tode* - Fungi Mecklenb I, 18 (1790) — *Pers.* - Syn. p. 112. — *Link* - Spec. Plant. II, 99. — *Tul.* - Sel. Fung. Carpol., III, 79. — *Sacc.* - Syll. IV, 638. — *De Wild* et *Dur* - Prodr. Fl. Belg. II, 359. — *Berlese* - Fungi moric. VII, n. 18. — *Oudemans* - Cat. Champ., Pays Bas, 527. — *Magnus* - Pilzfl. Tirol, p. 428.

[2] Paoletti, Atti della Società Veneto-Trentina di Scienze Naturali, Padova XI, 55, Tav. IV, fig. 1-8.

formazioni fruttifere sono stati eseguiti preparati in acqua e in glicerina. Inoltre si eseguirono inoculazioni con materiale prelevato dagli sporodochi stessi sopra substrati di brodo di fagioli neutro e di peptone agarizzati o non.

Preparato in glicerina.

Fu potuta constatare la struttura ifenchimatica dello stroma e degli sporodochi; ma in glicerina le ife non si dissolvono, anzi, restano fittamente addossate, talchè è difficile poterne determinare la struttura singola. (Fig. 1).

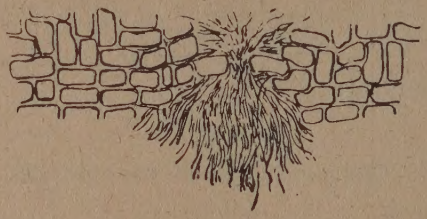

Fig 1

Preparato in acqua.

In acqua molto facilmente avviene lo spappolamento dello sporodochio e l'isolamento delle ife che in tal caso risultano evidenti nella loro singola struttura. (Fig. 3).

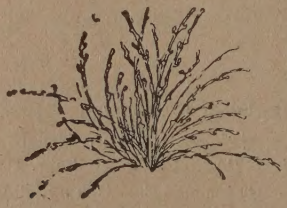

Fig 3

Esse si presentano incolori, di lunghezza rilevante, di spessore variabile, settate, alveolate, ramificate, talvolta raggruppate a cespuglio (Fig. 2) e costituenti ciuffi di conidiofori.

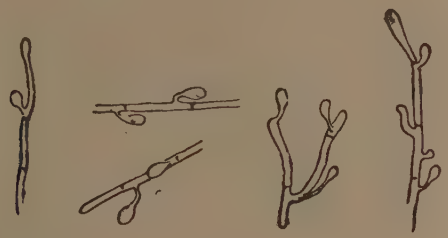

Fig 3

Anche questi sono ramificati e spesso, nell' immediata vicinanza di setti si staccano dei brevissimi rametti conidiofori portanti ciascuno un conidio di forma ovoide o leggermente ricurva.

I conidi sono di dimensioni relativamente costanti e misurano come dimensioni medie: μ 2,5-3 × μ 7-8.

Il preparato, lasciato a sè, dopo poche ore, si presenta all' osservazione in modo totalmente diverso: le ife e i conidi si raggruppano in agglomerati fittissimi dando luogo a formazioni caratteristiche, dal contorno irregolare e variamente colorate con tonalità di colore varianti dal rosso carminio al ranciato, dal giallo al verdastro, al bruno. (Vedi Tavola Fig. 1).

Tali colorazioni sono date presumibilmente da prodotti di formazione secondaria ciò che forse spiega la colorazione ranciata o bruna degli stromi, e la verdastra della materia

che si sostituisce all'amido nelle cellule attaccate dal parassita.[1]

Ciò che però interessa di far notare, è la presenza, in tutti i preparati eseguiti, di una forma batterica, unita costantemente al parassita fungino, che non potevasi trascurare per la uniformità dei suoi elementi, come una specie accidentale o banale di quelle immancabili sopra organi decadenti che si manifestino attaccati da parassiti con pustole, neoplasie, accartocciamenti ecc.

Infatti, dal progresso dello studio, il microrganismo è risultato essere una specie unica e dotata di caratteristiche proprietà.

Colture su piastra.

Sono state preparate piastre con substrato di agar fagiuoli coltivandovi il materiale prelevato dallo spappolamento in acqua sterile degli sporodochi rossi e bruni.

In esse si è avuto abbondantissimo sviluppo di colonie batteriche e fungine.

Le prime si presentavano piccole, rilevate, bianchiccie, opache, a contorno regolare e tondeggianti.

Le seconde, espanse, bianche, assai ramificate.

Colture per strisciamento.

Sono state eseguite con substrato di agar fagioli neutro e agar nutritivo al peptone.

Macroscopicamente lo sviluppo si è manifestato più intenso su agar di fagioli, quantunque i caratteri morfologici degli strisciamenti si siano dimostrati identici.

---

[1] Mayr, Op. cit.

Osservazioni microscopiche hanno dimostrato in esse la consociazione delle forme batterica e fungina: però, mentre il micelio occupava quasi esclusivamente la parte periferica della patina, i batteri restavano localizzati nella parte centrale della formazione.

Il fungo sopra questi substrati si riproduce con una notevole rapidità e la specie batterica ne accompagna lo sviluppo con indiscutibili rapporti.

Infatti, mentre in una osservazione fatta ad ore 11,30, temperatura 20° C, potevasi osservare una incipiente germinazione di conidi, alle ore 15,30 dello stesso giorno i conidi stessi avevano emesso già lunghi e sinuosi filamenti miceliari attorno ai quali erasi formata una caratteristica zooglea. (Fig. 4).

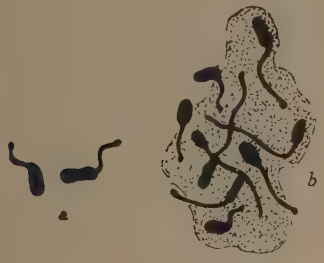

Fig 4

Dopo alcune ore il micelio del preparato stesso erasi sviluppato in guisa di fittissima rete e presentava interessanti fenomeni di chemiotassi (Vedi Tavola, Fig. 2). Caratteristiche formazioni filamentose sono state riscontrate in un preparato di materiale prelevato da becco flauto su agar peptone. (Fig. 5).

Il fatto dell' esistenza della forma batterica unica, rilevato dalle ricerche finora esposte, suggerì l' idea di accer-

tare quali rapporti potessero effettivamente intercedere tra fungo e batterio.

A tale scopo si dovette procedere all' isolamento dell' uno dall' altro, ricercando anzitutto i substrati adatti per lo sviluppo di ognuno.

Fig 5

Con materiale dei tubercoli rossi e bruni furono separatamente inoculati i seguenti substrati:

1. Brodo di fagiuoli neutro.
2. » » acido (ac. tartarico 1 $^0/_{00}$).
3. » carne neutro.
4. » » acido (ac. tartarico 1 $^0/_{00}$).
5. Decotto di corteccia di tiglio (ac. tartarico 1 $^0/_{00}$).

1) **Brodo fagiuoli neutro.**

a) *da tubercoli rossi.* — Sviluppo del fungo positivo, abbondante, manifestatosi con spessa coperta bianca superficiale: forte intorbidamento del liquido sottostante. Micelio bene sviluppato. Conidi numerosissimi in parte germinanti. In seno al liquido, numerose forme batteriche.

b) *da tubercoli bruni.* — Sviluppo del fungo positivo, molto abbondante: spessa coperta bianca superficiale: intorbidamento del liquido.

Micelio bene sviluppato, nettamente articolato con ife di diverso spessore.

Conidi numerosi

Forme batteriche presenti.

2) **Brodo di fagiuoli acido.**

a) *da tubercoli rossi.* — Sviluppo del fungo abbondantissimo. Micelio molto sviluppato. Forme batteriche scarse.

b) *da tubercoli bruni.* — Sviluppo id. c. s. Micelio id. id. Forme batteriche scarse.

3) **Brodo di carne neutro.**

a) *da tubercoli rossi.* — Sviluppo del fungo poco abbondante. Micelio poco sviluppato e scarsi conidi. Forme batteriche molto abbondanti.

b) *da tubercoli bruni.* — Idem. c. s.

4) **Brodo di carne acido.**

a) *da tubercoli rossi.* — Idem. c. s.;

b) *da tubercoli bruni.* — Idem. c. s.

5) **Decotto di corteccia acido.**

a) *du tubercoli rossi.* — Sviluppo del fungo rilevante. Sviluppo del micelio e dei conidi, notevole. Forme batteriche presenti.

b) *da tubercoli bruni.* — Idem. c. s.

Da ciò che è stato or ora esposto risulta evidente che i substrati più adatti per lo sviluppo del fungo, benchè ancora insufficientemente selezionanti, si sono dimostrati il

brodo di fagiuoli, specialmente quello acido, e il decotto di corteccia acido, ma in misura minore del primo.

Allo scopo di raggiungere la purezza delle colture, si è tentata una seconda inoculazione in substrati ancora più acidi e cioè in:

1) Brodo di fagiuoli acido (ac. tartarico 5 $^0/_{00}$)
2) » » » » (ac. tartarico 10 $^0/_{00}$)
3) Decotto corteccia acido (ac. tartarico 5 $^0/_{00}$)
4) » » » (ac. tartarico 10 $^0/_{00}$)

Dopo circa 10 giorni il risultato delle colture fu il seguente:

1) **Brodo di fagiuoli acido 5 $^0/_{00}$.**

a) *da tubercoli rossi.* — Sviluppo micelico abbondantissimo. Forme batteriche scarse.

b) *da tubercoli bruni.* — Idem. c. s.

2) **Brodo di fagiuoli acido 10 $^0/_{00}$.**

a) *da tubercoli rossi.* — Sviluppo micelico molto abbondante. Forme batteriche scarse.

b) *da tubercoli bruni.* — Idem. c. s.

3) **Decotto corteccia acido 5 $^0/_{00}$.**

a) da *tubercoli rossi.* — Sviluppo micelico scarso. Forme batteriche scarsissime.

b) *da tubercoli bruni.* — Idem. c. s.

4) **Decotto corteccia acido 10 $^0/_{00}$.**

a) *da tubercoli rossi.* — Idem. c. s.

b) *da tubercoli bruni.* — Idem. c. s.

Quindi il substrato di fagiuoli acido al 5 - 10 $^{0}/_{00}$ si mostra il meglio adatto alla coltura della *Tubercularia vulgaris.*

Per giungere però definitivamente all'isolamento delle forme, si è proceduto alla ulteriore inoculazione del fungo su carota (mezzo assai acido) prelevando il materiale da una delle colture su brodo di fagiuoli acidificato al 5 $^{0}/_{00}$, e del pari alla inoculazione del batterio su becco di flauto all'agar fagioli neutro, prelevando il materiale dal liquido torbo da una delle colture in brodo di fagiuoli neutro, ove l'intorbidamento del liquido era più evidente.

In tal modo si è giunti al risultato completo e definitivo tanto per l'uno quanto per l'altro.

Misurazioni eseguite allo scopo di determinare lo spessore delle ife miceliche, il cui polimorfismo si manifesta evidentissimo (Fig. 6), hanno dimostrato che le ife stesse possono variare da un minimo di spessore di μ 2,9 a un massimo di μ 4,16 passando per tutti i valori intermedi.

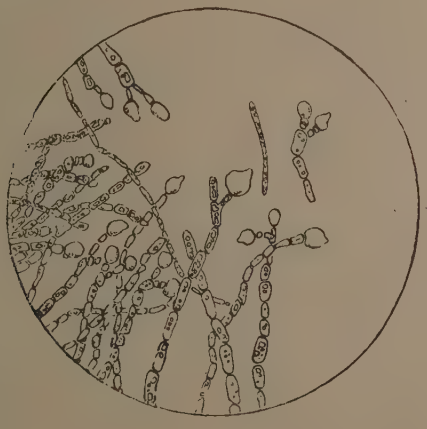

Fig. 6

Per poter procedere ad un primo riferimento sistematico della forma batterica, sono state eseguite cinque prove preliminari inoculando il materiale ricavato dalla coltura pura, nei seguenti substrati:

1) brodo di carne neutro
2) brodo di fagiuoli neutro
3) agar peptone
4) gelatina di carne
5) latte.

Dopo una settimana, osservazioni macroscopiche e microscopiche dettero i seguenti risultati:

Forma dei microrganismi. — Corti batteri mobili frequentemente accoppiati.

Dimensioni. — μ 0,72 - 0,80 × 0,97 - 1,32.

Prova del Gram. — positiva.

Sviluppo in brodo di fagiuoli. — positivo.

Sviluppo in brodo di carne. — positivo.

Sviluppo su agar peptone. — positivo con colorazione bruna del substrato.

Sviluppo in gelatina. — positivo con fluidificazione completa e colorazione giallastra del substrato.

Latte. — coagulazione.

Si tratta di una forma che ha molti punti di contatto cui il *Bact. fluorescens,* Flügge, ma che in ogni caso ne deve rappresentare per lo meno una razza ben distinta.

Il definitivo riferimento seguirà alla completa redazione della « Carta descrittiva » della forma, di cui si sta ultimando lo studio.[1]

---

[1] PEROTTI R., *Tecnica di biologia vegetale applicata all'agricoltura* (in corso di pubblicazione).

* * *

Come si è già accennato, allo scopo di ricercare quali relazioni potessero esistere fra il parassita fungino e la costante presenza della forma batterica nel ramo di tiglio attaccato e nelle colture artificiali del parassita, partendo dal presupposto che il batterio potesse emettere sostanze atte ad agevolare lo sviluppo del fungo, e che tali sostanze fossero di natura acida, — ipotesi avvalorata dalle precedenti ricerche — si sono portate su di una stessa piastra di agar, anse del fungo ed anse del batterio, depositandole più o meno vicine.

L'agar neutro, era stato addizionato di alcune gocce di azzurro bromo timolo.

Dopo alcuni giorni le colonie fungine e batteriche eransi abbondantemente sviluppate, le prime molto espanse e ramificate, le seconde rilevate e gelatinose (vedi Tavola Fig. 3).

Interessante però, più d'ogni altra constatazione, fu quella del cambiamento di colore del substrato, in corrispondenza delle colonie batteriche: esso infatti da verdastro era divenuto giallo, segno evidente *che il batterio emetteva sostanze acide.*

Invece, in corrispondenza dello sviluppo fungino il colore del substrato rimase non modificato; sicchè era ovvio di concludere che la *Tubercularia*, nelle condizioni dell'esperienza, non produceva nè acidi, nè basi.

Tali fatti, posti a confronto con i risultati ottenuti dalle esperienze precedenti, e, cioè, che il substrato preferito dal fungo per lo sviluppo è quello acido, indusse la convinzione che la costante presenza del fungo e del batterio doveva essere dovuta al fatto della emissione, da parte del microrganismo, di sostanze atte a determinare un substrato adatto alla vita del parassita fungino.

Conclusioni.

Dalle esperienze fatte e dai risultati che sono stati conseguiti e sopra esposti si è autorizzati a scendere alle seguenti conclusioni:

1. La *Tubercularia vulgaris* T., forma conidica della *Nectria cinnabarina* (T.) Fries, si manifesta sulle piante da essa attaccate, con pustolette (sporodochi) rilevate e consistenti, colorate in rosso ranciato o in bruno scuro, colorazioni che nulla hanno a che vedere con diversi stati metagenetici del fungo, ma non rappresentano che una conseguenza dell'età di sviluppo di esso e della eliminazione di sostanze colorate di cui si è ottenuta riproduzione artificiale nelle colture.

2. La *Tubercularia preferisce un substrato assai acido,* non ricco di sostanze proteiche.

3. Essa si accompagna negli sporodochi in natura, come nelle colture da cui con difficoltà si separa, con una forma batterica la quale, emettendo sostanze acide non può non favorire lo sviluppo del fungo, mentre i fenomeni chemiotattici osservati, dimostrano che questo può secernere od eliminare sostanze di natura fin qui non determinata, atte al nutrimento pel batterio.

4. Come conclusione ultima può affermarsi che fra le attività vitali del fungo, e quelle del batterio, si palesano rapporti tali da dimostrare una certa interdipendenza di fenomeni che possono avere notevole importanza nell'attacco parassitario sia dell'una come dell'altra forma.

Non è possibile per ora dire a quale delle due spetti la priorità dell'attacco e fino a quale misura la correlazione funzionale fra i due organismi, messa in rilievo dalla presente Nota, abbia valore nel progresso dell'attacco stesso.

È questo quanto sarà in seguito indagato.

L'acidità del materiale patologico legnoso, esaminato è risultata molto debole: il substrato quindi meglio può prestarsi all'attacco da parte del batterio che non di quello del fungo, che nel decotto dello stesso substrato raggiunge uno sviluppo molto limitato.

Ma una volta che la forma batterica acidogena abbia potuto svilupparsi, sono realizzate le condizioni per il rigoglioso sviluppo del fungo che, consumando l'acidità prodotta dal batterio ed eliminando sostanze a questo utili, ne determina l'ulteriore moltiplicazione.

È il caso che sembra debba tenersi presente nelle manifestazioni patologiche dovute a quei non pochi funghi con i quali, come la *Tubercularia,* il *Fusarium* ecc., si trovano fortemente colpiti rami di alberi deperiti o distaccati.

Ma simili fatti che si è avuto occasione di osservare nello stesso Laboratorio su foglie di Pesco e di Susino attaccate da *Exoascus,* lasciano dubitare che la presenza dei batteri negli attacchi parassitari fungini, ritenuti prima epifenomeni trascurabili, debbano venire considerati quali manifestazioni più o meno interessanti di *sinergesi.*

Dal Laboratorio di Patologia Vegetale
del R. Istituto Superiore Agrario di Pisa - ottobre 1926.

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA

Fig. 1. — Formazioni agglomerate di ife e conidi di *Tubercularia vulgaris,* Tode.

» 2. — Fenomeni chemiotassici tra micelio di *Tubercularia* e batteri.

» 3. — Sviluppo di *Tubercularia* su agar fagiuoli.

» 4. — Colture purificate di *Tubercularia* su carota.

R. Perotti e G. Bonaventura. — Ricerche ed osservazioni sulla biologia ed in ispecie sul parassitismo della *Tubercularia vulgaris*, Tode.

Fig. 1.

Fig. 2.

Fig. 3.

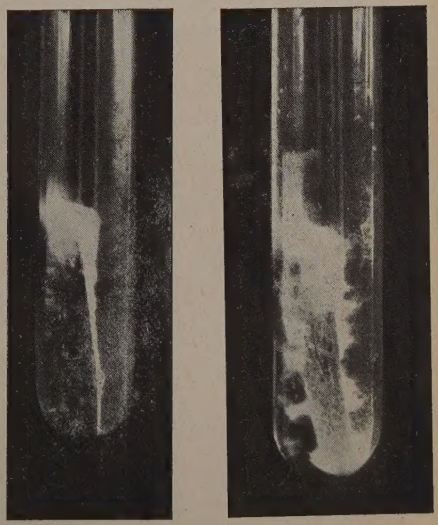

Fig. 4.